

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO98/42835 (43) 国際公開日 1998年10月1日(01.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01146 (22) 国際出願日 1998年3月18日(18.03.98) (30) 優先権データ 特願平9/93044 1997年3月26日(26.03.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 時野隆至(TOKINO, Takashi)(JP/JP) 〒064-0806 北海道札幌市中央区南六条西18丁目3-14 Hokkaido, (JP) 中村祐輔(NAKAMURA, Yusuke)(JP/JP) 〒226-0000 神奈川県横浜市緑区あざみ野1-17-33 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, ID, KR, MX, SG, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: HUMAN GENES (54) 発明の名称 ヒト遺伝子 (57) Abstract Novel human genes usable in gene diagnosis and development of new therapeutics. Specifically, human genes containing a base sequence encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or a part of the same, in particular, ones which are under the specific transcriptional regulation by a tumor suppressor gene p53.		

(57)要約

特に遺伝子診断並びに新しい治療法の開発に利用できる新規なヒト遺伝子を提
供するものである。

配列番号：1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を
含むヒト遺伝子、特に癌抑制遺伝子 p 5 3 による特異的な転写制御下にある上記
遺伝子。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CJ	コートジボアール	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CM	カメルーン	JP	日本	PL	ポーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	SD	スーダン		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SI	スロヴェニア		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ				

明 細 書

ヒト遺伝子

技術分野

本発明は、ヒトの疾患の予防、診断及び治療の指針として有用な遺伝子、より詳しくは、癌抑制遺伝子 p 5 3 による特異的な転写制御下にあるヒト遺伝子に関し、遺伝子診断並びに新しい治療法の開発に利用可能な遺伝子に関する。

背景技術

癌抑制遺伝子 p 5 3 の変異は、ヒト癌に見出される遺伝的変異において最も普遍的なものであり、ヒトの発癌に関与する最も重要な遺伝子のひとつとされている (Hollstein M., et al., Science (Washington DC), 253: 49-53, 1991) 。 p 5 3 は転写因子として作用し (Vogelstein B., et al., Cell, 70: 523-526, 1992) 、配列特異的な DNA への結合により、p 2 1 / W A F 1、MDM 2、GADD 4 5、BAX、cyclin G、IGF-BP 3、PCNA 及び GML 等の各種遺伝子を活性化することが確認されている (El-Deiry W. S., et al., Cell, 75: 817-825, 1993 ; Wu X., et al., Genes Dev., 7: 1126-1132, 1993 ; Kastan M. B., et al., Cell, 71: 587-597, 1992 ; Miyashita T., et al., Cell, 80: 293-299, 1995 ; Okamoto K., et al., EMBO. J., 13: 4816-4822, 1994 ; Buckbinder L., et al., Nature, 377: 646-649, 1995 ; Morris G. E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 895-899, 1996 ; Furuhashi T., et al., Oncogene, 13: 1965-1970, 1996) 。このうち、p 2 1 / W A F 1、BAX 及び GML は、p 5 3 により仲介される細胞周期停止及びアポトーシスの主要因子と思われる。また、GADD 4 5 は、DNA 修復に重要な役割を果たしている。

しかして、p 5 3によって制御されている遺伝子の確認は、p 5 3の生物生理学的機能の解明に必須である。すなわち、かかるp 5 3標的遺伝子の同定、解明は、癌研究の分野はもとより、その標的遺伝子を利用する新しい癌の診断乃至治療法の開発の面からも斯界で望まれているところである。

尚、本発明者等は、ヒトゲノムの機能的p 5 3結合部位（functional p53-binding sites或はp 5 3タグサイト：p53-tagged sites）の近隣にp 5 3標的遺伝子の候補を見出すようにデザインされた方法確立しており、この方法に関して、本発明者はその発現が抗癌剤の感受性に相関すると考えられているGMLの単離に既に成功している（Furuhata, T., et al., Oncogene, 13: 1965-1970, 1996）。

本発明は、癌抑制遺伝子p 5 3の標的遺伝子（p53-target genes）或はp 5 3誘導型遺伝子（p53-inducible genes）、すなわちp 5 3による特異的な転写制御下にある新規なヒト遺伝子を見出し、これを同定して斯界で要望される所望の情報を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者等は、ヒトゲノムからの機能的p 5 3タグサイトのクローニングにおいて、野生型p 5 3によって誘導される新規な遺伝子を単離し、これが上記目的に合致する新規なヒト遺伝子であることを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、配列番号：1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むヒト遺伝子、特に、配列番号：2で示される塩基配列の全部又は一部を含む遺伝子を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、野生型p 5 3によるP 2 X M遺伝子発現の誘導を調べるために、野生

型 p 5 3 アレルを欠く大腸癌細胞株 SW 4 8 0 における p 5 3 誘導 mRNA の発現を RT-PCR により解析した結果を示す写真である。

図 2 は、ヒト組織における P 2 X M のノーザンブロット解析結果を示す写真である。

図 3 及び 4 は、P 2 X M 遺伝子のゲノム構成を示す図であり、図 3 は 1 9 1 遺伝子のエクソン／イントロン境界のヌクレオチド配列を示し、図 4 の (b) はエクソン及び p 5 3 結合部位の存在位置を示し、図 4 の (c) はコスミド p 5 3 - 1 9 1 の p 5 3 結合部位と p 5 3 コンセンサス結合配列の比較を示す。

図 5 及び 6 は、各種 P 2 X レセプターのアミノ酸配列を示す図である。

図 7 は、別態様スプライシングバリエントを示す図である。

図 8 ～ 1 0 は、骨格筋及び各種癌細胞株におけるスプライシングバリエントの発現を RT-PCR により解析した結果を示す写真である。

図 1 1 は、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「P 2 X M」と名付けられたクローンの有する DNA 配列から演繹されるものを挙げることができ、その塩基配列は、配列表に示される通りである。

本発明遺伝子は、例えば配列番号：2で示されるように、一本鎖 DNA 配列で表されるが、本発明はかかる一本鎖 DNA 配列に相補的な DNA 配列やこれらの両者を含むコンポーネントもまた包含する。尚、配列番号：2に示す本発明遺伝子の配列は、これによりコードされる各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合

せ例であり、本発明遺伝子はこれに限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮することができる〔Nucleic Acids Res., 9: 43-74, 1981〕。

更に本発明遺伝子には、上記で示されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸乃至アミノ酸配列を置換、欠失、付加等により改変してなり、同様の機能を有する同効物をコードするDNA配列もまた包含される。これらポリペプチドの製造、改変（変異）等は天然に生じることもあり、また翻訳後の修飾により或は遺伝子工学的手法により、天然の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）を、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154: p.350, 367-382, 1987 ; 同 100: p.468, 1983 ; Nucleic Acids Res., 12: p.9441, 1984 ; 続生化学実験講座1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p.105, 1986〕等の方法により改変したり、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89: p.4801, 1967 ; 同 91: p.3350, 1969 ; Science, 150: p.178, 1968 ; Tetrahedron Lett., 22: p.1859, 1981 ; 同 24: p.245, 1983〕により変異させたDNAを合成したり、或はそれらの組合せにより取得することができる。

本発明にかかる配列番号：2に示す遺伝子は、p 5 3による特異的な転写制御下にある遺伝子であり、生体においてp 5 3によりその発現が活性化され、癌の抑制に寄与すると考えられる。従って、本発明遺伝子の発現を目的とする遺伝子治療或は本発明遺伝子産物の生体への投与は、癌の予防及び治療に極めて有用であると考えられる。殊に、遺伝性的高発癌体質であるLi-Fraumeni症候群や、p 5 3遺伝子のLOHや、変異が認められる各種の癌等の場合のようにp 5 3による癌抑制機能が失われた結果として癌化に向かうとされる個体において、本発明遺伝子乃至同遺伝子産物の利用が好適と考えられる。

尚、上記した本発明遺伝子を利用する遺伝子治療或は同遺伝子産物を利用する

(Clontech Lab. Inc.) 等より市販の各種 cDNA ライブラリー等を用いることもできる。

cDNA ライブラリーからの本発明遺伝子のスクリーニングは、前記通常の方法に従い実施できる。該スクリーニング方法としては、例えば cDNA の産生する蛋白質に対して、該蛋白質特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより、対応する cDNA クローンを選択する方法、目的の DNA 配列に選択的に結合するプローブを用いたプラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せを例示できる。ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子の DNA 配列に関する情報をもとにして化学合成された DNA 配列等を用いるのが一般的であり、勿論既に取得された本発明遺伝子やその断片もかかるプローブとして利用できる。

更に各細胞、組織より抽出、単離精製された天然抽出物の部分アミノ酸配列情報に基づき、センス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

また、本発明遺伝子の取得に際しては、PCR 法 (Science, 230: 1350-1354, 1985) による DNA/RNA 増幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長の cDNA が得られ難いような場合には、レース法 (RACE: Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6): 35-38, 1994)、殊に 5' -RACE (Frohman M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 8998-9002, 1988) の採用が好適である。かかる PCR 法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従い合成できる。

尚、増幅させた DNA/RNA 断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法等によればよい。

上記で得られる本発明遺伝子或は各種 DNA 断片等の塩基配列の決定も、常法に従うことができ、例えばジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74

癌処置においては、必ずしも本発明遺伝子又はそのコードする産物の全て、すなわち全配列からなる遺伝子或は産物が必要とされることはなく、本発明にかかる配列番号：2に示す遺伝子における所望の機能と実質的に同質な機能を保持する限りにおいて、前記したそれらの改変体或はそれらの一部配列からなる遺伝子或は産物が良好に使用できる。

本発明遺伝子を利用して、すなわち例えば、これを微生物のベクターに組み込み、形質転換された微生物を培養することによって、上記各遺伝子でコードされるp53関連蛋白を容易にかつ安定して製造することができる。

また本発明の遺伝子を利用して得られる各蛋白を用いて、特異抗体を作成することもできる。ここで抗原として用いられるコンポーネントとしては、上記遺伝子工学的手法に従って大量に産生される蛋白を用いることができ、得られる抗体はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよく、それぞれの蛋白の精製、測定、識別等に有利に利用できる。

本発明遺伝子は、本発明によって開示された配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造できる〔Molecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)；続生化学実験講座「遺伝子研究法I、II、III」、日本生化学会編（1986）等参照〕。

例えば、ヒトcDNAライブラリー（各遺伝子の発現される適当な起源細胞より常法に従い調製されたもの）から、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78: 6613, 1981；Science, 222: 778, 1983等〕。

上記において、起源細胞としては、目的の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示され、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAへの変換（合成）とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。また、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社

: 5463-5467, 1977) やマキサムーギルバート法 [Method in Enzymology, 65: 499, 1980] 等により行なうことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いても容易に行ない得る。

本発明遺伝子の利用によれば、通常の遺伝子組換え技術 (例えば、Science, 224: p.1431, 1984 ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 130: p.692, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: p.5990, 1983及び前記引用文献等参照) に従うことにより、各組換え体蛋白を得ることができる。該蛋白の製造は、より詳細には、本発明遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換えDNAを作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養することにより行なわれる。

ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のいずれも用いることができる。該真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 [Cell, 23: 175-182, 1981] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220, 1980] 等がよく用いられているが、これらに限定される訳ではない。

脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr [Mol. Cell. Biol., 1: 854, 1981] 等を例示できる。また、真核微生物としては、酵母が一般によく用いられ、中でもサッカロミセス属酵母を有利に利用できる。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 1-5, 1983] 等を利用できる。また、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、原核生物遺伝子融合ベクターを好ましく例示でき、該ベクターの具体例としては、例えば分子量26000のGSTドメイン (S.

japonicum 由来)を有する p G E X - 2 T K や p G E X - 4 T - 2 等を例示できる。

原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌が一般によく用いられる。これらを宿主とする場合、例えば該宿主菌中で複製可能なプラスミドベクターを用い、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及び S D (シヤイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン (例えば A T G) を付与した発現プラスミドを利用するのが好ましい。上記宿主としての大腸菌としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 株等がよく用いられ、ベクターとしては一般に p B R 3 2 2 及びその改良ベクターがよく用いられるが、これらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターをも利用できる。プロモーターとしては、例えばトリプトファン(trp) プロモーター、lpp プロモーター、lac プロモーター、PL/PRプロモーター等を使用できる。

かくして得られる所望の組換え DNA の宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的の蛋白が生産、発現される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

上記により、形質転換体の細胞内、細胞外乃至細胞膜上に目的とする組換え蛋白が発現、生産、蓄積乃至分泌される。

各組換え蛋白は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作〔「生化学データブックII」、1175-1259 頁、第1版第1刷、1980年 6月23日株式会社東京化学同人発行；*Biochemistry*, 25(25): 8274-8277, 1986；*Eur. J. Biochem.*, 163: 313-321, 1987 等参照〕により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈殿剤による処

理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、及びこれらの組合せ等を例示でき、特に好ましい上記方法としては所望の蛋白を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、各種ヒト組織における本発明遺伝子の発現の検出を行なうことができる。これは常法に従って、例えばRT-PCR〔Reverse transcribed-Polymerase chain reaction: Kawasaki E. S., et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27, 1991〕によるRNA増幅により、またノーザンブロッティング解析〔Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989〕等により、いずれも良好に実施し得る。

尚、前記PCR法を採用する場合において、用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる本発明遺伝子に特有のものである限り何等限定はなく、本発明遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することができる。通常これは常法に従って20～30ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができる。

しかして、本発明はかかる新規なヒト遺伝子に特有の検出に有用なプライマー及び／又はプローブをも提供するものである。

実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

実施例 1

(1) コスミドライブラリーのスクリーニング

p 5 3 タグサイト (クローン P 5 3 - 1 9 1) は、時野等の方法に従い特定した (Tokino T., et al., Hum. Mol. Gene, 3: 1537-1542, 1994)。p 5 3 タグサイトを含む [³²P] 標識プローブを使用して、ヒト末梢血リンパ球のコスミドライブラリーをスクリーニングした。得られたコスミド: p 5 3 - c o s 1 9 1 を E c o R I で消化し、該 E c o R I フラグメントを p B l u e s c r i p t I I S K (-) (Stratagene) にサブクローン化した。DNA配列決定は、キット (Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit; ABI) を使用して A B I 3 7 7 DNAシーケンサーにて行った。

(2) cDNAクローニング

コスミド p 5 3 - c o s 1 9 1 に存在する遺伝子の単離に、エクソン増幅と R A C E の両者を行った。

コスミド p 5 3 - c o s 1 9 1 を B a m H I 及び B g l I I にて消化し、該制限酵素フラグメントを、エクソントラップベクター p S P L 3 (Gibco-BRL) の B a m H I サイトにサブクローン化し、L i p o f e c t A C E (Gibco-BRL) を用いて C O S 7 細胞に導入した。該細胞を 2 4 時間培養後、T R I Z O L (Gibco-BRL) により全RNAを調製した。ファーストストランド cDNA 合成及びスプライスしたフラグメントの P C R 増幅は、North 等の方法に従い実施した (North M. A., et al., Mamm. Genome, 4: 466-474, 1993)。cDNA フラグメントは、p B l u e s c r i p t I I S K (-) にサブクローン化され、上記のとおり T 3 又は T 7 プライマーを使用して配列決定された。候補のひとつとしての配列 1 9 1 E 1 を、cDNA 増幅キット (Marathon cDNA amplification kit; Clontech) を用い、骨格筋ポリ (A) + RNA を鋳型として使用する 5' - 及び 3' - R A C E に付した。

(3) RT-PCR解析

p 5 3 発現ベクター、p 5 3 - w t 又は p 5 3 - 2 7 3 (Kern S. E., et al.,

Science (Washington DC), 256: 827-830, 1992)、による大腸癌細胞株 SW480 の一過的 DNA 導入及び cDNA の調製は、Furuhata 等の報告に従った [Furuhata T., et al., Oncogene, 13: 1965-1970, 1996]。全 RNA は、Superscript II (Gibco-BRL) を使用して逆転写した。RT-PCR の指数的成長相は、20-30 サイクルにおいて決定され、同一反応により得られた cDNA 間の半定量的比較を可能とした。各 PCR 反応は、200 ng の全 RNA からの cDNA を使用して実施した。PCR 溶液は文献 [Han H-J., et al., Hum. Mol. Genet., 4: 237-242, 1995] 記載のものを使用し、反応は、94℃2 分の初期変性ステップに次ぐ 30 サイクル (191E1 の場合) 又は 25 サイクル (p21/WAF1 及び GAPDH の場合) のサイクリングステップ (94℃30 秒、55-60℃30 秒、72℃1 分) にて行った (GeneAmp PCR system 9600; Perkin Elmer)。プライマー配列は、次表 1 のとおりである:

表 1

プライマー	塩基配列
(191E1)	
E1S2	5' - AGCCACTCACTGGTGGGA - 3'
E1A2	5' - CCCGGTGACGAGGATGTCTGA - 3'
(p21/WAF1)	
W1S	5' - GTTCCTTGTGGAGCCCGGAGC - 3'
W2A	5' - GGTACAAGACAGTGACAGGTC - 3'
(GAPDH)	
HGS	5' - CAACTACATGGTTTACATGTTC - 3'
HGA	5' - GCCAGTGGACTCCACGAC - 3'

増幅された cDNA は、3% NuSieve GTG (2:1) アガロースゲル

にて分離した。

(4) ノーザンブロット解析

正常ヒト組織由来のポリ(A)+RNAを含むノーザンブロット(Clontech)を本発明cDNAのヌクレオチド909-1583に相当するランダムプライム [32 P] 標識DNAプローブによりハイブリダイズした。ブロットを50℃にて洗浄し(0.1×SSC/0.1% SDS) -80℃にて24時間オートラジオグラフィーの感光に付した。

(5) FISH

FISHは、Inazawa 等の方法に従い実施した(Inazawa J., et al., Genomics, 17: 153-162, 1993)。ヒト分裂中期染色体は、常法(thymidine synchronization / bromodeoxyuridine release technique)に従い調製した。ハイブリダイゼーションに先立ち、分裂中期の細胞は染色(Hoechst 33258)及びUV照射した。コスミドクローンp53-cos191は、ニックトランスレーションによりビオチン-16-dUTPにより標識し、変性した分裂中期染色体とハイブリダイズした。Aluリピートのような散在する繰返し配列によるノイズシグナルを除去する為に、染色体 in situ 抑制(chromosomal in situ suppression)ハイブリダイゼーションを使用した。ハイブリダイズシグナルは、FITC-アビジンにて検出した。ハイブリダイズシグナルの詳細な位置決定は、複製-Gバンドの可視化によって行った。

(6) 相同性検索

DNA比較は、FASTAプログラムによるデータベース検索により行った(non-redundant nucleic acid sequence database 又は non-redundant protein sequence database ; ヒトゲノム解析センター、東京大学医科学研究所)。

(7) 結果

(イ) p53誘導遺伝子のクローニング

p53タグサイトのひとつ、クローンP53-191をプローブとして、ヒト

ゲノムコスミドライブラリーをスクリーニングし、コスミドクローン：p 5 3 - c o s 1 9 1を得た。このコスミドに由来する配列がp 5 3による転写制御を受けているかどうかを調べる為に、R T - P C R解析を行った。R T - P C Rでは、野生型又は変異型p 5 3 c D N Aを含む発現ベクターで一過的にD N A導入したS W 4 8 0細胞（S W 4 8 0 - w t 5 3又はS W 4 8 0 - m t 5 3）より調製したR N Aを鋳型として使用した。候補配列のひとつである1 9 1 E 1を試験した結果、S W 4 8 0 - m t 5 3（変異型）における場合に比べて、S W 4 8 0 - w t 5 3（野生型）における発現が著しく増加しており（図1参照）、1 9 1 E 1の発現は野生型p 5 3によって誘導されていると考えられた。

尚、図1は、野生型p 5 3アレルを欠く大腸癌細胞株S W 4 8 0におけるp 5 3誘導m R N Aの発現をR T - P C Rにより解析した結果を示す写真である。

これによれば、S W 4 8 0を、p 5 3 - w t（W）又はp 5 3 - 2 7 3（M）で一過的に形質転換して、R T - P C R増幅によりP 2 X M遺伝子の発現を確認した。R N Aサンプルは、逆転写酵素（R T）存在下（+）又は非存在下（-）に逆転写反応に供した。R N A鋳型はG A P D H転写物の増幅によりコントロールし、これは両サンプルにおいて同程度のシグナルを与えた。

次いで、1 9 1 E 1をプローブとして使用したc D N Aスクリーニング並びに5' - 及び3' - R A C Eを行ない、3 5 5 2 b pからなるc D N Aを単離した。「P 2 X M」と名付けられた該c D N Aは、4 3 1アミノ酸の蛋白をコードする1 2 9 3 b pのオープンリーディングフレームを有している。その全D N A配列は、配列番号：3に示すとおりである。即ち、P 2 X M c D N Aのコード領域は、塩基番号4 6から1 3 3 8に示され、潜在的なトランスメンブランドメイン（M 1及びM 2）は、それぞれアミノ酸番号で3 3～4 9番目及び3 2 4～3 4 4番目のアミノ酸配列にあり、またvoltage-gated K⁺ channels H 5領域の類似セグメント（H）は、アミノ酸番号3 0 6～3 1 9に存在していた。

該c D N Aをプローブとするノーザンブロット解析によれば、骨格筋において

図5及び6は、各種P2Xレセプターのアミノ酸配列を示すものであり、図中、箱囲みした残基は、P2XMの配列及びラットP2X1-P2X7レセプターに共通して保存されている。上線は、保存されている2つの疎水性領域(M1及びM2)及びH5を示す。星印は、P2XMの潜在的N-結合グリコシレーションサイトを示す。

本発明のかかる遺伝子によってコードされているアミノ酸配列は、同様にこれらP2Xレセプターファミリーの基本的特徴を有しており、これはヒトP2Xレセプターファミリーの新規なメンバーであると考えられる。

(ハ) 構造解析

上記cDNAとその対応するゲノムDNA配列(p53-cos191)の比較により、エクソン/イントロン境界及び近接イントロンの近傍DNA配列を含む、この遺伝子のゲノム構成が明らかとなった(図3参照)。この遺伝子は、約12kbのゲノム領域におよんでおり、12のエクソンからなる(図4のb参照)。p53タグサイトは、この遺伝子の約1.6kb下流に存在している(図4のb及びc参照)。コスミドp53-cos191をプローブとする蛍光in situ ハイブリダイゼーション法(FISH法)により、この遺伝子の染色体位置は、22q11と確認された(図11参照:特異的なハイブリダイゼーションシグナルがヒト染色体バンド22q11に認められ、他の染色体上にはシグナルは認められなかった)。

(ニ) 骨格筋(Skeletal muscle)における別態様スプライシング(alternative splicing)

骨格筋より調製したRNAのRT-PCR後の直接DNA配列決定では、エクソン10、エクソン10-11又はエクソン1の一部(エクソン1のドナーサイトから下流18bp)を欠く、別態様スプライシングの3種のインフレーム転写物(AL1、L2及びAL3)が確認された(図7参照)。

この別態様スプライシングの模式図を図7に示す。正常骨格筋からの主要な

R T - P C R 増幅産物は、N 1 と N 2 で示されている。3つのタイプのバリエーションは、A L 1、A L 2 及び A L 3 で示されている。

これら別態様スプライシング転写物のそれぞれは、3の倍数のヌクレオチドを欠失しており、いずれもそのリーディングフレームは維持されていた。

図 3 及び 4 に示すように、エクソン 1 - 2 及びエクソン 1 1 は、順次、トランスメンブラン領域 M 1 及び M 2 に相当する。該 M 1 及び M 2 領域は、エクソン 1 0 によってコードされる近接疎水性セグメント (H 5) とともに、ion pore and ion-binding サイトを形成するとされている (Valera S., et al., Nature, 371: 516-519, 1994 ; Brake A. J., et al., Nature, 371: 519-523, 1994) 。構造的推定によれば、これらのエクソンは、生物学的機能に重要なドメインをコードしているものと思われる。

(ホ) ヒト癌細胞株における発現と別態様スプライシング

近年、異常な別態様スプライシングがヒト癌の発生、進展及び又は転移に何等かの関与をなしていることが報告されている (Gunthert U., et al., Cell, 65: 13-24, 1991 ; Arch R., et al., Science (Washington DC), 257: 682-685, 1992) 。そこで、4種の横紋筋肉種、2種の骨肉腫及び1種の脂肪肉腫に由来する細胞株で、本発明遺伝子の mRNA レベル及び別態様スプライシングを R T - P C R 解析により評価した。結果を図 8 ~ 1 0 に示す。同図において、R T - P C R は、細胞株から調製した全 RNA (200ng) を用いて前記に従い実施したものであり、各レーン (Cell lines) は、横紋筋肉種 (A204: レーン 1, A673: レーン 2, Hs729T: レーン 3, RD: レーン 4) , 脂肪肉腫 (SW872: レーン 5) 及び骨肉腫 (NY: レーン 6, Hu03N1: レーン 7) におけるものである。また、骨格筋の全 RNA (200ng) から調製し希釈 (1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 1 6, 1 : 3 2) した c D N A を用いて P C R 増幅した結果を併せて示している ("Skeletal muscle" レーン) 。

図 8 及び 9 は、前記の N 1、A L 1、N 2、A L 2 及び A L 3 における結果を

示すものであり、それらのPCR産物サイズは、順次、392、314、450、384及び306bpである。尚、RNA鋳型は、GAPDHの増幅をととしてコントロールし、これは全てのサンプルにおいて同様のシグナルを与えた（図10）。

その結果、この遺伝子の発現は、試験した7種の細胞株中、ひとつの横紋筋肉種細胞株（A673）において顕著に減少していた。また、これら細胞株における別様スプライシングは、次のとおりであった。エクソン10及びエクソン10-11を欠くスプライスバリエントは、癌細胞におけるその転写パターンが、正常骨格筋でのそれに類似していた。一方、エクソン1の一部を欠失しているバリエントの割合は、正常骨格筋では少なかったのに対し、ひとつの横紋筋肉種細胞株（RD）及びひとつの骨肉腫（Hu03N1）では相対的により多く認められた。

（へ）考察

本発明により、ATP-gated ion channels をコードするP2Xファミリーの新規なメンバーであると考えられる新規なp53誘導型遺伝子が単離された。p53結合性配列は、この遺伝子を含む全コスミドDNAの配列決定により、該遺伝子の下流約1.6kbに見出された。p53により制御されている遺伝子の機能的p53結合部位は、今まで、これら遺伝子のイントロン又はプロモーター領域中に見出されてきている。本発明の新規遺伝子においては、該機能的p53結合部位は、その下流に位置していた。これらの結果は、p53結合部位がエンハンサー配列として働く可能性を示唆している。

本発明cDNAから推定されるアミノ酸配列は、P2Xレセプターファミリーのメンバー、特にラットP2X6（80%同一性）、に相同性を有する。しかしながら、ラットP2X6 mRNAが脳の広い範囲において見出されるのに対し、この遺伝子は骨格筋において特異的に発現されており、従って、これがラットP2X6のヒト相同物であるとは考えられない。P2Xレセプターは、ATP-gated ion channels に分類され、細胞死やシナプス伝達のような細胞外ATP

誘導型生物活性のメディエーターとして機能するとされてきている〔Zheng L. M., et al., J. Cell Biol., 113: 279-288 1991 ; Zoetewij J. P., et al., Biochem. J., 288: 207-213, 1992 ; Kennedy C., et al., Nature, 377: 385-386, 1995〕。また、アミノ酸レベルでの配列類似性は、R P - 2 と呼ばれる部分配列 c D N A との間でも認められる。R P - 2 は、ガンマ照射によりアポトーシスを起こしているラット胸腺細胞において誘導される m R N A からの subtractive ハイブリダイゼーションによって単離されている〔Owens G. P., et al., Mol. Cell. Biol., 11: 4177-4188 1991 〕。A T P は、細胞内カルシウム濃度を増加することにより、胸腺細胞、肝細胞及び各種のリンパ球細胞株において細胞死を誘導する。これらの事実によれば、本発明遺伝子は、骨格筋における p 5 3 依存性アポトーシス（おそらく細胞外 A T P により仲介される）に密接に関連しているものと考えられる。

ノーザンブロット解析により、骨格筋において 3. 6 k b 転写物が検出された。この遺伝子の発現は、4 種の横紋筋肉種細胞株のひとつにおいて著しく減少していた。加えて、トランスメンブランドメイン M 1 の一部をコードするエクソン 1 の一部を欠失するマイナーなスプライスバリエントが、残り 6 種の癌細胞株の内 2 つにおいて相対的により多く認められた。試験した癌細胞株で別態様スプライシングで生じる異常産物の割合が高かったことは注目され、アミノ末端での不均質性の生物学的意義を明らかにする事が重要となる。更に、横紋筋肉種を含む種々の組織の癌では、この遺伝子を含む染色体領域（22q11）に欠失があることが報告されており〔Newsham I., et al., Genomics, 19: 433-440, 1994 ; Schofield D. E., et al., Genes Chromosom. Cancer, 15: 10-17, 1996 ; Biegel J. A., et al., Genes Chromosom. Cancer, 16: 94-105, 1996〕, この遺伝子がこの領域に存在する癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。

産業上の利用可能性

ヒトゲノムからの機能的 p 5 3 タグサイトのクローニングにおいて、野生型 p 5 3 によって誘導される新規な遺伝子を単離した。この c DNA 配列は、P 2 X レセプターファミリーに相同性を示す 4 3 1 アミノ酸ペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含んでいる。このペプチドは、P 2 X ファミリーのメンバーの主要な特徴を有し (ATP-gated ion channels)、また、プログラム細胞死 (programmed cell death) を誘導された胸腺細胞において活性化される遺伝子、R P - 2、と類似する。この遺伝子は、主に骨格筋に発現され、P 2 X M (P2X specifically expressed in skeletal muscle) と名付けられた。該 P 2 X M 遺伝子は、細胞増殖の抑制及び／又は骨格筋におけるアポトーシスに関与すると思われる。

この遺伝子の発現は、試験した 4 種の横紋筋肉種細胞株のひとつにおいて著しく抑制されていた。トランスメンブラン領域 M 1 をコードするエクソン 1 の一部を欠くマイナーなスプライスバリエントが、試験した 7 種の癌細胞株の 2 つにおいて相対的に多かった。このことは、このスプライシングによって生じる変異産物の比率が、これらの癌細胞株において著しく増加することを示唆する。この遺伝子は、杆状癌 (rhabdoid tumor) において欠失が知られている染色体バンド 2 2 q 1 1 に位置していた。

本発明によれば、癌抑制遺伝子 p 5 3 による特異的な転写制御下にある新規なヒト遺伝子が提供され、該遺伝子を用いれば、該遺伝子の各種組織での発現の検出や、そのコードする産物の構造及び機能等を解析でき、また、該遺伝子産物の遺伝子工学的製造が可能となり、これらにより、癌の発生、進展、転移等の解明やその診断、予防、治療等に有用な技術が提供される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 4 3 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 蛋白

配列 :

Met Gly Ser Pro Gly Ala Thr Thr Gly Trp Gly Leu Leu Asp Tyr Lys

1 5 10 15

Thr Glu Lys Tyr Val Met Thr Arg Asn Trp Arg Val Gly Ala Leu Gln

20 25 30

Arg Leu Leu Gln Phe Gly Ile Val Val Tyr Val Val Gly Trp Ala Leu

35 40 45

Leu Ala Lys Lys Gly Tyr Gln Glu Arg Asp Leu Glu Pro Gln Phe Ser

50 55 60

Ile Ile Thr Lys Leu Lys Gly Val Ser Val Thr Gln Ile Lys Glu Leu

65 70 75 80

Gly Asn Arg Leu Trp Asp Val Ala Asp Phe Val Lys Pro Pro Gln Gly

85 90 95

Glu Asn Val Phe Phe Leu Val Thr Asn Phe Leu Val Thr Pro Ala Gln

100 105 110

Val Gln Gly Arg Cys Pro Glu His Pro Ser Val Pro Leu Ala Asn Cys

115 120 125

Trp Val Asp Glu Asp Cys Pro Glu Gly Glu Gly Gly Thr His Ser His

130 135 140

Gly Val Lys Thr Gly Gln Cys Val Val Phe Asn Gly Thr His Arg Thr

145	150	155	160
Cys Glu Ile Trp Ser Trp Cys Pro Val Glu Ser Gly Val Val Pro Ser			
	165	170	175
Arg Pro Leu Leu Ala Gln Ala Gln Asn Phe Thr Leu Phe Ile Lys Asn			
	180	185	190
Thr Val Thr Phe Ser Lys Phe Asn Phe Ser Lys Ser Asn Ala Leu Glu			
	195	200	205
Thr Trp Asp Pro Thr Tyr Phe Lys His Cys Arg Tyr Glu Pro Gln Phe			
	210	215	220
Ser Pro Tyr Cys Pro Val Phe Arg Ile Gly Asp Leu Val Ala Lys Ala			
225	230	235	240
Gly Gly Thr Phe Glu Asp Leu Ala Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Ile			
	245	250	255
Arg Val His Trp Asp Cys Asp Leu Asp Thr Gly Asp Ser Gly Cys Trp			
	260	265	270
Pro His Tyr Ser Phe Gln Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Arg Thr			
	275	280	285
Ala Thr His Trp Trp Glu Gln Pro Gly Val Glu Ala Arg Thr Leu Leu			
	290	295	300
Lys Leu Tyr Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Thr Gly Gln Ala Gly			
305	310	315	320
Lys Phe Gly Leu Ile Pro Thr Ala Val Thr Leu Gly Thr Gly Ala Ala			
	325	330	335
Trp Leu Gly Val Val Thr Phe Phe Cys Asp Leu Leu Leu Leu Tyr Val			
	340	345	350
Asp Arg Glu Ala His Phe Tyr Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Glu Ala Lys			

355 360 365
 Ala Pro Lys Ala Thr Ala Asn Ser Val Trp Arg Glu Leu Ala Leu Ala
 370 375 380
 Ser Gln Ala Arg Leu Ala Glu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Ala Pro Ala
 385 390 395 400
 Pro Thr Ala Thr Ala Ala Gly Ser Gln Thr Gln Thr Pro Gly Trp Pro
 405 410 415
 Cys Pro Ser Ser Asp Thr His Leu Pro Thr His Ser Gly Ser Leu
 420 425 430

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 2 9 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : DNA (cDNA)

配列 :

ATGGGCTCCC CAGGGGCTAC GACAGGCTGG GGGCTTCTGG ATTATAAGAC GGAGAAGTAT 60
 GTGATGACCA GGAAGTGGCG GGTGGGCGCC CTGCAGAGGC TGCTGCAGTT TGGGATCGTG 120
 GTCTATGTGG TAGGGTGGGC GCTCCTCGCC AAAAAAGGCT ACCAGGAGCG GGACCTGGAA 180
 CCCAGTTTT CCATCATCAC CAAACTCAAA GGGGTTTCCG TCACTCAGAT CAAGGAGCTT 240
 GGAAACCGGC TGTGGGATGT GGCCGACTTC GTGAAGCCAC CTCAGGGAGA GAACGTGTTC 300
 TTCTTGGTGA CCAACTTCCT TGTGACGCCA GCCCAAGTTC AGGGCAGATG CCCAGAGCAC 360
 CCGTCCGTCC CACTGGCTAA CTGCTGGGTC GACGAGGACT GCGCCGAAGG GGAGGGAGGC 420
 ACACACAGCC ACGGTGTAAG AACAGGCCAG TGTGTGGTGT TCAATGGGAC CCACAGGACC 480
 TGTGAGATCT GGAGTTGGTG CCCCCTGGAG AGTGGCGTTG TGCCCTCGAG GCCCCTGCTG 540
 GCCCAGGCCC AGAACTTCAC ACTGTTTCATC AAAAACACAG TCACCTTCAG CAAGTTCAAC 600

```

TTCTCTAAGT CCAATGCCTT GGAGACCTGG GACCCACCT ATTTTAAGCA CTGCCGCTAT   660
GAACCACAAT TCAGCCCCTA CTGTCCCGTG TTCCGCATTG GGGACCTCGT GGCCAAGGCT   720
GGAGGGACCT TCGAGGACCT GGC GTTGCTG GGTGGCTCTG TAGGCATCAG AGTTCACTGG   780
GATTGTGACC TGGACACCGG GGA CTCTGGC TGCTGGCCTC ACTACTCCTT CCAGCTGCAG   840
GAGAAGAGCT ACAACTTCAG GACAGCCACT CACTGGTGGG AGCAACCGGG TGTGGAGGCC   900
CGCACCCCTGC TCAAGCTCTA TGAATCCGC TTCGACATCC TCGTCACCGG GCAGGCAGGG   960
AAGTTCGGGC TCATCCCCAC GGCCGTCACA CTGGGCACCG GGGCAGCTTG GCTGGGCGTG  1020
GTCACCTTTT TCTGTGACCT GCTACTGCTG TATGTGCATA GAGAAGCCCA TTTCTACTGG  1080
AGGACAAAGT ATGAGGAGGC CAAGGCCCGG AAAGCAACCG CCAACTCTGT GTGGAGGGAG  1140
CTGGCCCTTG CATCCAAGC CCGACTGGCC GAGTGCCTCA GACGGAGCTC AGCACCTGCA  1200
CCCACGGCCA CTGCTGCTGG GAGTCAGACA CAGACACCAG GATGGCCCTG TCCAAGTTCT  1260
GACACCCACT TGCCAACCCA TTCCGGGAGC CTG                                     1293

```

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 6 9 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : DNA (cDNA)

配列の特徴 :

特徴を表わす記号 : CDS

存在位置 : 4 6 . . 1 3 3 8

特徴を決定した方法 : E

配列 :

```

CTGCCATGCT GACTCATGTG CCCGCAGCTA GCAGGAGCTG GCAGC ATG GGC TCC   54
Met Gly Ser

```


CCA GGG GCT ACG ACA GGC TGG GGG CTT CTG GAT TAT AAG ACG GAG AAG	102
Pro Gly Ala Thr Thr Gly Trp Gly Leu Leu Asp Tyr Lys Thr Glu Lys	
5 10 15	
TAT GTG ATG ACC AGG AAC TGG CGG GTG GGC GCC CTG CAG AGG CTG CTG	150
Tyr Val Met Thr Arg Asn Trp Arg Val Gly Ala Leu Gln Arg Leu Leu	
20 25 30 35	
CAG TTT GGG ATC GTG GTC TAT GTG GTA GGG TGG GCG CTC CTC GCC AAA	198
Gln Phe Gly Ile Val Val Tyr Val Val Gly Trp Ala Leu Leu Ala Lys	
40 45 50	
AAA GGC TAC CAG GAG CGG GAC CTG GAA CCC CAG TTT TCC ATC ATC ACC	246
Lys Gly Tyr Gln Glu Arg Asp Leu Glu Pro Gln Phe Ser Ile Ile Thr	
55 60 65	
AAA CTC AAA GGG GTT TCC GTC ACT CAG ATC AAG GAG CTT GGA AAC CGG	294
Lys Leu Lys Gly Val Ser Val Thr Gln Ile Lys Glu Leu Gly Asn Arg	
70 75 80	
CTG TGG GAT GTG GCC GAC TTC GTG AAG CCA CCT CAG GGA GAG AAC GTG	342
Leu Trp Asp Val Ala Asp Phe Val Lys Pro Pro Gln Gly Glu Asn Val	
85 90 95	
TTC TTC TTG GTG ACC AAC TTC CTT GTG ACG CCA GCC CAA GTT CAG GGC	390
Phe Phe Leu Val Thr Asn Phe Leu Val Thr Pro Ala Gln Val Gln Gly	
100 105 110 115	
AGA TGC CCA GAG CAC CCG TCC GTC CCA CTG GCT AAC TGC TGG GTC GAC	438
Arg Cys Pro Glu His Pro Ser Val Pro Leu Ala Asn Cys Trp Val Asp	
120 125 130	
GAG GAC TGC CCC GAA GGG GAG GGA GGC ACA CAC AGC CAC GGT GTA AAA	486
Glu Asp Cys Pro Glu Gly Glu Gly Gly Thr His Ser His Gly Val Lys	

135	140	145	
ACA GGC CAG TGT GTG GTG TTC AAT GGG ACC CAC AGG ACC TGT GAG ATC			534
Thr Gly Gln Cys Val Val Phe Asn Gly Thr His Arg Thr Cys Glu Ile			
150	155	160	
TGG AGT TGG TGC CCC GTG GAG AGT GGC GTT GTG CCC TCG AGG CCC CTG			582
Trp Ser Trp Cys Pro Val Glu Ser Gly Val Val Pro Ser Arg Pro Leu			
165	170	175	
CTG GCC CAG GCC CAG AAC TTC ACA CTG TTC ATC AAA AAC ACA GTC ACC			630
Leu Ala Gln Ala Gln Asn Phe Thr Leu Phe Ile Lys Asn Thr Val Thr			
180	185	190	195
TTC AGC AAG TTC AAC TTC TCT AAG TCC AAT GCC TTG GAG ACC TGG GAC			678
Phe Ser Lys Phe Asn Phe Ser Lys Ser Asn Ala Leu Glu Thr Trp Asp			
200	205	210	
CCC ACC TAT TTT AAG CAC TGC CGC TAT GAA CCA CAA TTC AGC CCC TAC			726
Pro Thr Tyr Phe Lys His Cys Arg Tyr Glu Pro Gln Phe Ser Pro Tyr			
215	220	225	
TGT CCC GTG TTC CGC ATT GGG GAC CTC GTG GCC AAG GCT GGA GGG ACC			774
Cys Pro Val Phe Arg Ile Gly Asp Leu Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr			
230	235	240	
TTC GAG GAC CTG GCG TTG CTG GGT GGC TCT GTA GGC ATC AGA GTT CAC			822
Phe Glu Asp Leu Ala Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Ile Arg Val His			
245	250	255	
TGG GAT TGT GAC CTG GAC ACC GGG GAC TCT GGC TGC TGG CCT CAC TAC			870
Trp Asp Cys Asp Leu Asp Thr Gly Asp Ser Gly Cys Trp Pro His Tyr			
260	265	270	275
TCC TTC CAG CTG CAG GAG AAG AGC TAC AAC TTC AGG ACA GCC ACT CAC			918

3. 6 kb の転写物が検出されており（図 2 参照）、従って、該 cDNA は、ほぼ完全な転写物を含んでいるものと考えられる。

尚、図 2 はヒト組織における P2XM のノーザンブロット解析結果を示す写真であり、各種組織（Heart, Brain, Placenta, Lung, Skeletal muscle, Kidney, Spleen, Thymus, Prostate, Testis, Ovary, Small intestine, Colon, Leukocyte）からのポリ(A)⁺ RNA（2 μ g/レーン）のブロットを P2XM cDNA とハイブリダイズさせた結果を示すものである。

（ロ）相同性検索

蛋白データベースの相同性検索によれば、本発明にかかるアミノ酸配列は、ATP-gated ion channel (P2X) レセプターファミリー〔Valera S., et al., Nature, 371: 516-519, 1994 ; Brake A. J., et al., Nature, 371: 519-523, 1994〕と類似性を有し、特に、ラット P2X6〔Collo G., et al., J. Neurosci., 16: 2495-2507 1996〕と 80% の同一性を示した（図 5 及び 6 参照）。

図 3 及び 4 は、P2XM 遺伝子のゲノム構成を示す図であり、図 3(a) は、191 遺伝子のエクソン/イントロン境界のヌクレオチド配列を示している。エクソン及びイントロンの配列は、順次、大文字及び小文字で示されている。図 4 中、(b) は、エクソンの存在位置を、そのサイズに応じた、番号付き箱により示したものである。また、図 4 中(c) は、コスミド p53-191 の p53 結合部位と p53 コンセンサス結合配列を比較したものであり、矢印は、p53 コンセンサス結合配列（ペンタマー）を示す。大文字のヌクレオチドは、コンセンサスに一致するゲノム配列を示し、小文字はコンセンサス配列と相違する配列を示している。P2X レセプター（P2X1-X6）ファミリーの全てのメンバーは、2 つのトランスメンブラン領域（M1 及び M2）、voltage-gated K⁺ channel の H5 領域に類似しているセグメント（H5）、N-グリコシレーションサイト及び進化上保存されている 11 システイン残基を有している（図 5 及び 6 参照）。

TCT GAC ACC CAC TTG CCA ACC CAT TCC GGG AGC CTG TAGCCGTTCC 1348
Ser Asp Thr His Leu Pro Thr His Ser Gly Ser Leu
420 425 430
CTGCTGGTTG AGAGTTGGGG GCTGGGAAGG GCGGGGCCCT GCCTGGGGAT TTCAAGGATG 1408
AGGCCCCAGC ATGGAGGATT GGGGGTAGAA TTCCACCCTT GAACCCAGC AAACAGTCCC 1468
TCCCCTGACT CCCACCTTGG TAGGGTGCTG CCTCAGGGAG CCATAAAAGT CGGCTGTGTT 1528
TTGAGACGGC GACAGAACCT GACCCGTGGA GACTGGGAGA GCCCAGCAGG CACCTGTATT 1588
GCAGGGCTCC GACTGCATGT GGCAGGGGCT CCTGCTGCGT CTGGGCCTGA AGGTCTCTCT 1648
CCCAGTGCTC TGTCCCCAGT GTTCCTAGCA GAGGTATGCT TACCAGCTG 1697

Ser Phe Gln Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Arg Thr Ala Thr His

280

285

290

TGG TGG GAG CAA CCG GGT GTG GAG GCC CGC ACC CTG CTC AAG CTC TAT 966

Trp Trp Glu Gln Pro Gly Val Glu Ala Arg Thr Leu Leu Lys Leu Tyr

295

300

305

GGA ATC CGC TTC GAC ATC CTC GTC ACC GGG CAG GCA GGG AAG TTC GGG 1014

Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Thr Gly Gln Ala Gly Lys Phe Gly

310

315

320

CTC ATC CCC ACG GCC GTC ACA CTG GGC ACC GGG GCA GCT TGG CTG GGC 1062

Leu Ile Pro Thr Ala Val Thr Leu Gly Thr Gly Ala Ala Trp Leu Gly

325

330

335

GTG GTC ACC TTT TTC TGT GAC CTG CTA CTG CTG TAT GTG GAT AGA GAA 1110

Val Val Thr Phe Phe Cys Asp Leu Leu Leu Leu Tyr Val Asp Arg Glu

340

345

350

355

GCC CAT TTC TAC TGG AGG ACA AAG TAT GAG GAG GCC AAG GCC CCG AAA 1158

Ala His Phe Tyr Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Glu Ala Lys Ala Pro Lys

360

365

370

GCA ACC GCC AAC TCT GTG TGG AGG GAG CTG GCC CTT GCA TCC CAA GCC 1206

Ala Thr Ala Asn Ser Val Trp Arg Glu Leu Ala Leu Ala Ser Gln Ala

375

380

385

CGA CTG GCC GAG TGC CTC AGA CGG AGC TCA GCA CCT GCA CCC ACG GCC 1254

Arg Leu Ala Glu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Ala Pro Ala Pro Thr Ala

390

395

400

ACT GCT GCT GGG AGT CAG ACA CAG ACA CCA GGA TGG CCC TGT CCA AGT 1302

Thr Ala Ala Gly Ser Gln Thr Gln Thr Pro Gly Trp Pro Cys Pro Ser

405

410

415

請求の範囲

1. 配列番号：1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むヒト遺伝子。
2. 配列番号：2で示される塩基配列の全部又は一部を含む請求項1記載の遺伝子。
3. 請求項1又は2記載の遺伝子の一部の塩基配列を有することを特徴とする請求項1又は2記載の遺伝子検出用プローブ又はプライマー。

図 1

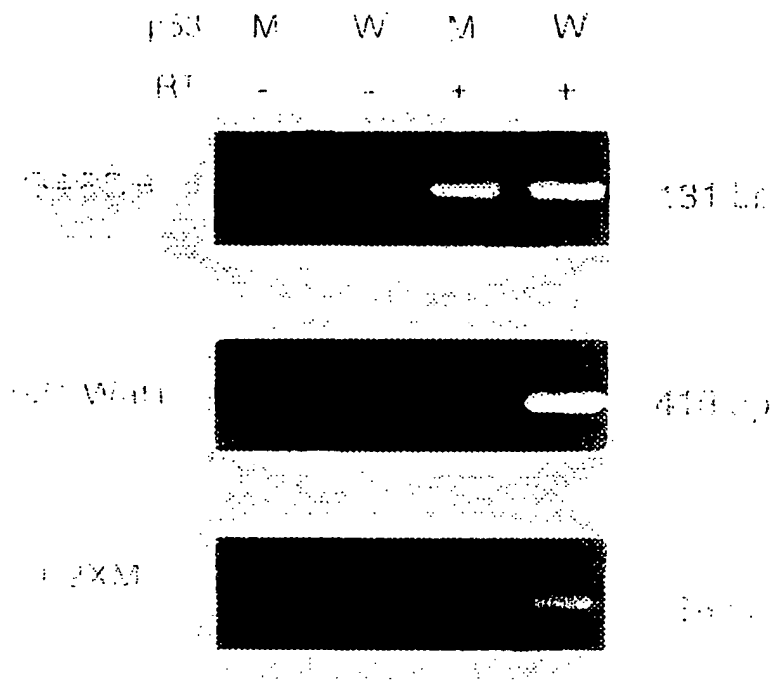
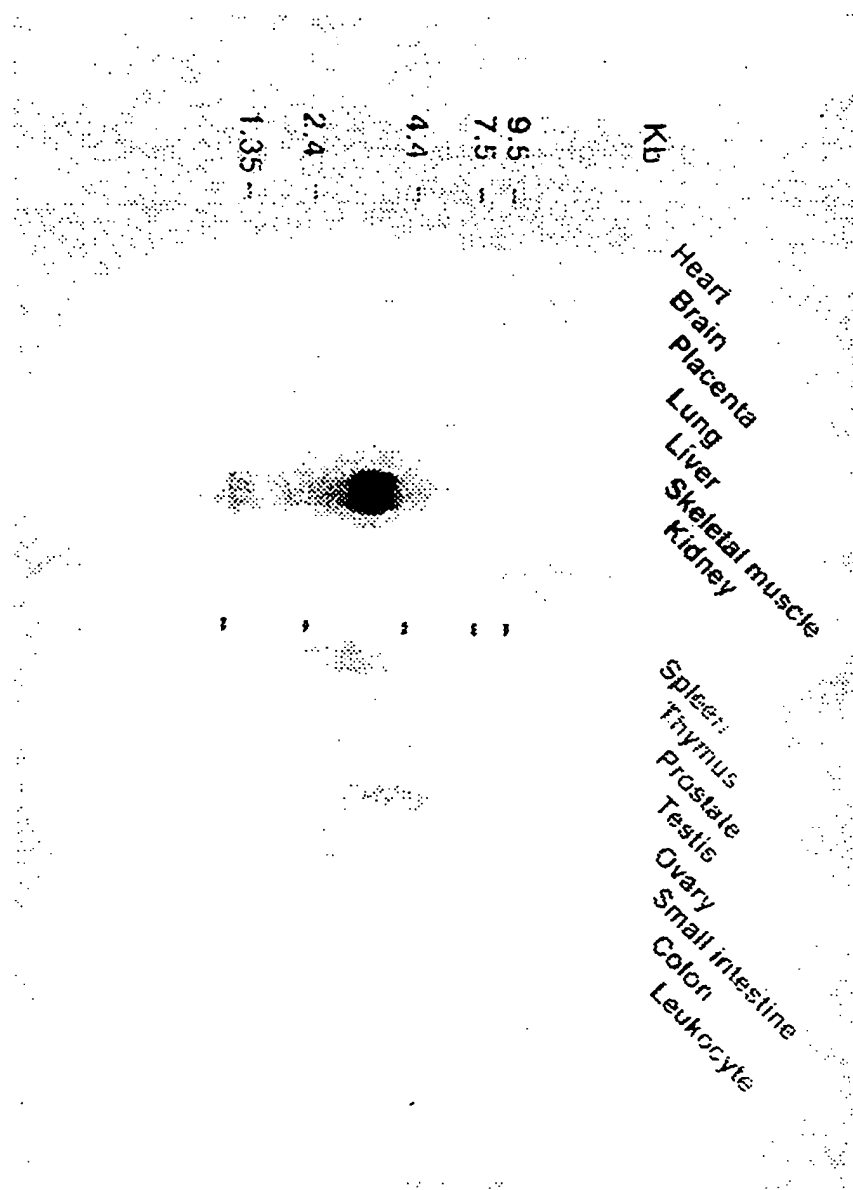


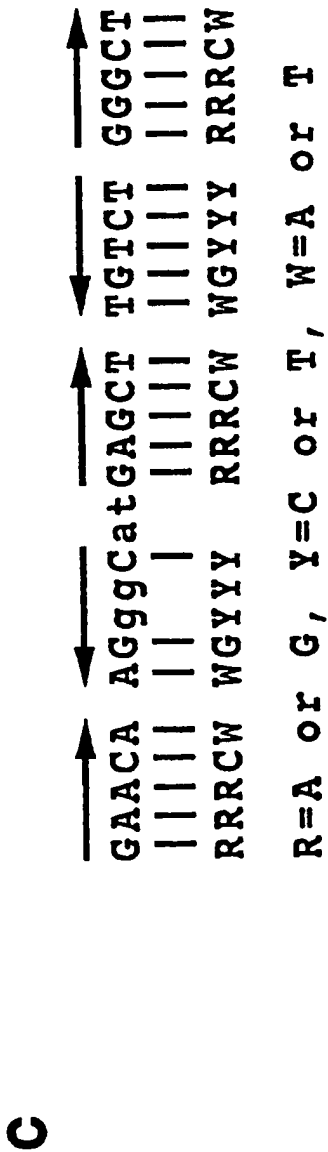
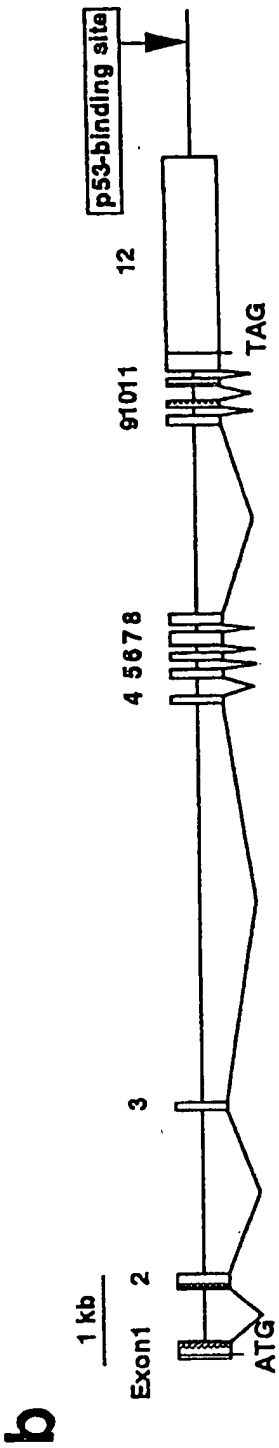
図 2



 3
a

Exon	Length(bp)	Coordinates	Splice acceptor	Splice doner
1	>179	1-179	-	GTG GTA GG /gtaagagag Val Val Gly
2	151	180-330	cctccccag/ G TGG GCG Gly Try Ala	CCA CCT CAG/gtggggggcc Pro Pro Gln
3	72	331-402	gcctcctag/GGA GAG AAC Gly Glu Asn	TGC CCA GAG/gtgagttta Cys Pro Glu
4	76	403-478	ccacctcag/CAC CCG TCC His Pro Ser	AGC CAC G /gtaagtgtc Ser His Gly
5	94	479-572	gttttctag/ GT GTA AAA Gly Val Lys	GTG CCC TC /gtaagtgtc Val Pro Ser
6	81	573-653	cacctgcag/ G AGG CCC Ser Arg Pro	TTC TCT AA /gtaagcaga Phe Ser Lys
7	142	654-795	tcctccccag/ G TCC AAT Lys Ser Asn	GCG TTG CTG/gtgggtccc Ala Leu Leu
8	110	796-905	tatgtgcag/GGT GGC TCT Gly Gly Ser	AAC TTC AG /gtgaggccc Tyr Asn Arg
9	94	906-999	tgcctcacag/ G ACA GCC Arg Thr Ala	ACC GGG CAG/gtaggcaca Thr Gly Gln
10	66	1000-1065	ctctctcag/GCA GGG AAG Ala Gly Lys	CTG GGC GTG/gtgagtgcg Leu Gly Val
11	78	1066-1143	ctctccccag/GTC ACC TTT Val Thr Phe	TAT GAG GAG/gtgagctga Tyr Glu Glu
12	>2409	1144-3552	catctgcag/GCC AAG GCC Ala Lys Ala	-

4



5

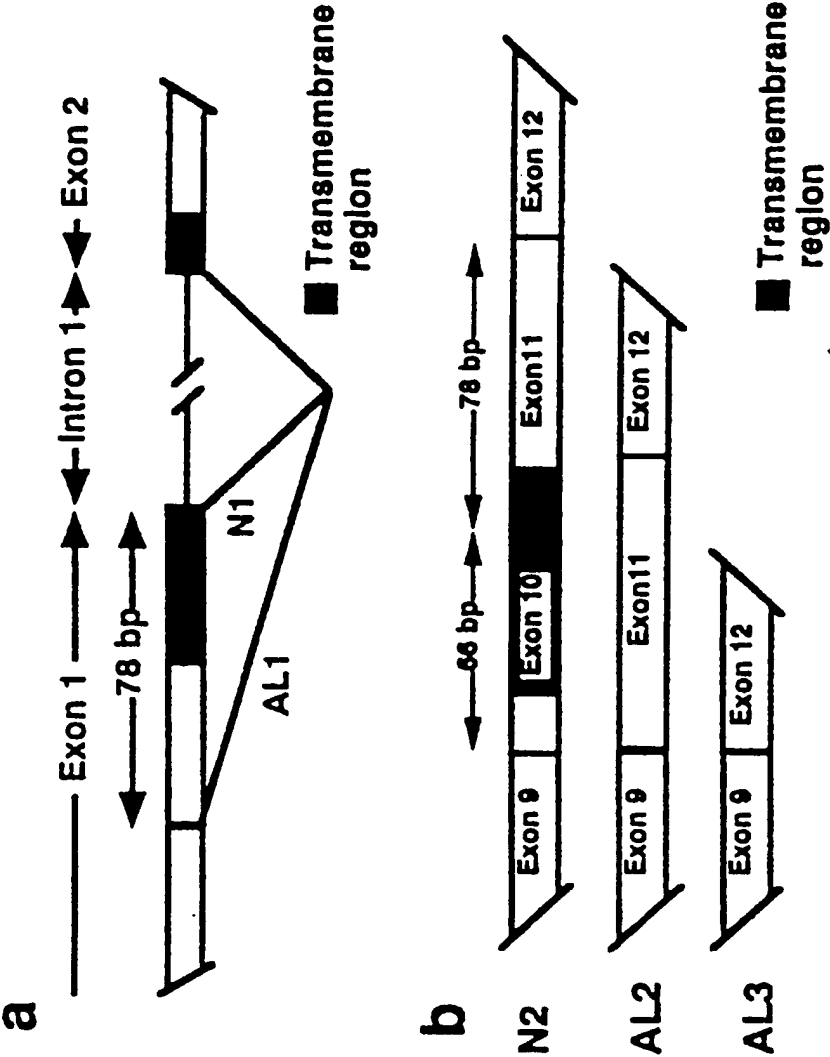
M1

P2X0	M--GSPGATIGUGLLDYATEKYIVATRNHRVGA LQRLLOFGIVVYVVGWALLAKGQTORRDLEPPQFSIITKAG-----VSUTQIKELGHRNLNDVADPVK	92
P2X1	M--ARRLODELSAFFFFEYDTPRNLVVRNKKVGVIFRLIQVLVYVIGWVPVTEKSTQTSDDL- ISSVSVKLAG-----LATQLOGLGQPVHVDVADIVF	92
P2X2	M--VRLARGCWSAPWDYETPKVIVVRNRRLGCVHNVQLLLLYPFWYVPVQKSTQDSFGPESSTIITKAG-----ITHSPDKVNDVEEYVK	88
P2X3	M-----NCISDPFFTEYETKSVVVKSWTIGI INRAVQLLIISYPGVVPLFEKANIQVRDAIESSVVTKVAG-----FGYAHNRVNDUSDIVT	82
P2X4	MA--GCCSVLGSPLPEYDTPRIVLIRSRYGLNHRVQLLLIAYVIGWVPVTEKSTQTSDDL- VSSVTKKAG-----VAVRHTSOLGPRINDVADYVI	91
P2X5	M--GQAAWKGFLSLFDYETKAPVVAKSKAVGLLYRVQLILLILLINVLIRKSTQDIDFSLQSAVVTKAG-----VAYRHTTHLGERLNDVADPVI	93
P2X6	MASAVAAALVSNGLDYETKAYVHTRNCHVGSQRLLQGVVYVVGWALLAKGQYQNDNDPQISVITKAG-----VSVQVKELEKRLNDVADPVR	94
P2X7	M-----PACCSWHDVFOYETKAKVTRIQSVHGTIKNLIHNTVSYV-SFALNSDKLITKAKEPL-ISSVETKNGVAEVTENVTGEGVTKLVHGIPDADYF	94
*		
P2X8	PPQGENVFLVNTFLVTPAQVQGRTEPHPSVPLANENWDEDCPEPEGGTHSHSVNFGQCVV-PNGTHRTCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	190
P2X1	PAHGDSPPVVMHNFIVTPQDTQGHCAE--NPEGGICDDSGTTPGKAERKAQELRTGHCVP-PNGTVRTCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	189
P2X2	PPGCGSVVSIITRISVTPSQGLGTCQPSHRVSSSTCHSDDCIAGQLDNQGHETRTGHCVPYVHGDSKTCENSWCPWEDG-TSDNHPLGEMAPNFTLLI	187
P2X3	PPQGSTSVFVIITKHIVTENHOGFCPE--NEKATRCVSDSQ--GPEPPGGELTGCQVN-YSSVLRCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	175
P2X4	PAQEENSLFIMHIVTVNORSTCEP-IPDTSICNSDADETPGLRTHSSVATGCVV-PHESVATCEVANAFCPWNEDVGVTPAPLAAENFTLLV	189
P2X5	PSQGENVFFVVTNLIVTPHROGICAFREGIPGECSEDDCHAGESSVAGHETGCLRVGSTRGCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	192
P2X6	PSQGENVFFVVTNLIVTPAQVQGRTEPHPSVPLANENWDEDCPEPEGGTHSHSVNFGQCVV-PNGTHRTCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	192
P2X7	LPLQGENSPFVHTNYLASEGQEQKLCPEYPS-RGTOCHSDQGCITAGWNDPQSKGTGRCIP-IDOKRACEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	192
*		
P2X8	KNTVTFSKPNFSKSNALETHWDPIPKHCRTEPHPSVPLANENWDEDCPEPEGGTHSHSVNFGQCVV-PNGTHRTCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	282
P2X1	KNSISFPFRFVVRNRLVEEVNCTYMKKLYHKIQBPLCPVFNLTGVVRESQDPRSLAENGWVGLTIDMKCDLQNHVVRHCKPIVQFGLYG---EKHLS	286
P2X2	KNSIHTPKFKYKSKGNHAS-QKSDYLKHCTFFDQSDPYCTIPLRGTIVERAGENFTZLAHAGGVIGVITINWNCDDLSESECHNPKYSPRRLLD--KYDPAS	284
P2X3	KNSIRPPLFNPEKGNLPLNLTDDIKRCYHPPEXAPFCPLRVGDVVKFAGQDFAKLARTGGVLAGIKGNVCDLQNDKANDQCIPIKYSPTRLDGVSEKSSVS	275
P2X4	KNNIHTPKPNFSKRNHLPNITTSYLKSCITNAQDPPCFTEFRLEIIVEDAGHSPQEMANVGGTNGIQTAKDCNLDRAASLCLPRVSPRRLLDTRDLEHNVS	289
P2X5	KNFIRFPKPNFSKANVLETDNKHPLKTCMP--SSRHLVCTPLRGLSIVRVHAGADFDIALAGGVIGVITIDMKCDLQNDKANDQCIPIKYSPTRLDGVSEKSSVS	290
P2X6	KNTVTFSKPNFSKSNALETHWDPIPKHCRTEPHPSVPLANENWDEDCPEPEGGTHSHSVNFGQCVV-PNGTHRTCEIHWFCPNESSG-VVPSRPLLAQNDNFTLPI	284
P2X7	KNNIDPPGHNITTRNLLP---GNNISCTPHKTHNPQCTPLRGLSIPQETICEHPTPEVAVQGGIAGTETIYDQCNLDGSHRCKPNSPRLDDATHTESLP	288

 6

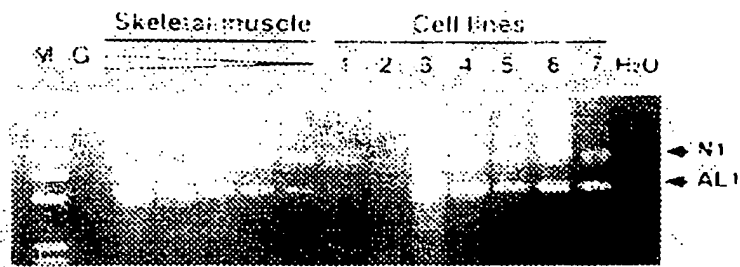
H5		M2	
P2X8	-SYNRTATENHWEQPGVEARFELKLYGIRFDILITGQAGKFGIIP	TAVTLGTCGAANLGVVTPFPD	LLLLLYVDREAHFYHRTKYEBAKAPKATANSVWREL
P2X1	PGFNTRFARHFVQ-NGTNRRLFKVPGLHFDILVWDGKAGKFDIIP	TMTHTIGSGIGIPGATVLCDD	LLLLLEILPRHHYKQKKPKYAEADMGPGECEHDPVA
P2X2	SGYHFRFAKYKINGTTTTRFLIKAYGIRIDVINEGQAGKFSIIP	TIYNLATLTSISGSPLED	WILLTFMNHKLYSHAKKPDVVRTPKHPSRWVTL
P2X3	PGYNTRFAKYKMHGSEYRFLKAPGIRFDVIVNGHAGKFNIIIP	TISSVAAPTSGVGTVD	IIILNPLIGADHYKARKPEEVETETTKGTASTHPV
P2X4	PGYNTRFAKYIRDLAGKEQRDLTKAYGIRFDIIVFCKAGKFDIIP	THINVGSLALLGATVLCDD	VIVYCHKKKYYIRDKKYYKIVEDYEQCLSGEMHQ
P2X5	SGYNTRFARIYRDPNGVEFRDLTKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIIP	TVINIGSGIALHAGAPFD	LVLIYLIRSEFYRDKKPEYRGGKEDANVEVEAH
P2X6	-GYNTRTANYHWAASGVESRSLKLYGIRFDIIVTQAGKFAIIP	TAITVGTGAANLGNVTPLED	LLLLLYVDREAGFYHRTKYEBAKAPKATTHSA
P2X7	PGYNTRVAKYIKEN-GHEKRTFLIKAPGVIRFDIIVFGTGKFDIIP	LVVYIGSTLSYFGLATV-GL	DLIIHTYASTCCRSRVYPSKCCCEPCAVHEYYTRK
P2X8	ALASQARLAECLERRSSAPAPTATAAGSQDTQTPGHPCPSSDTHLPTHSSSL		
P2X1	TSSTLGLQEHRTS		
P2X2	ALVLQIIPPPSHYSQDPPSPSGEGPTLGECAELPLAVQSDRRPC	SISALTEQNVVDILGQNHGQRPPIPEPSQDSTSDPKGLAQL	
P2X3	PASDAQTVEXQSTDSGAYSIGH		
P2X5	EMEQRRPEDEPLERVRODEQSQELAQSGRKKQNSHCQVILEPARFGLREHAIVNVIAQSQILHPVKT		
P2X7	KCEPIVEPKPTLKYVSFVDEPHIWMVDQLLGKSLQDVKGQEVPRPQDPL	ELSRLSLSLHSPPIPGQPEEHQQLQIEAVPRSRDSPDWCQCGHCLPSQ	
P2X7	LPENRRALEELCCRRKPGQITTSFLPKIVLSREALQULLLLYQEP	LLALEGEAINSKIRHCAVRSYATHRPVSQDMADPAILPSCCRHKIRKEPPKTTQG	
P2X7	QYSGFKYPT		

7



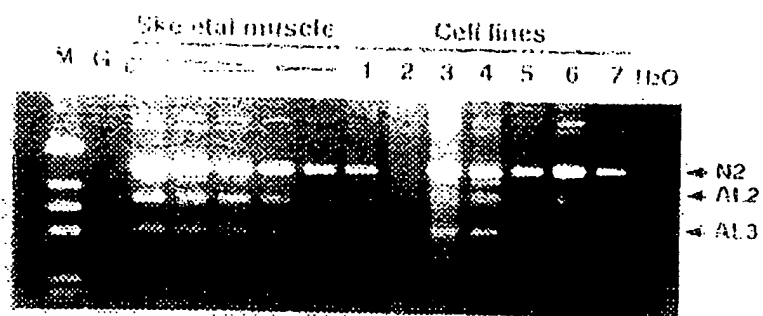
8

C



9

Q



10

e

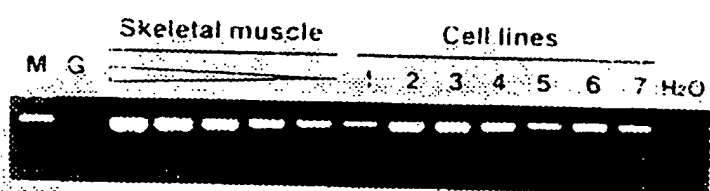
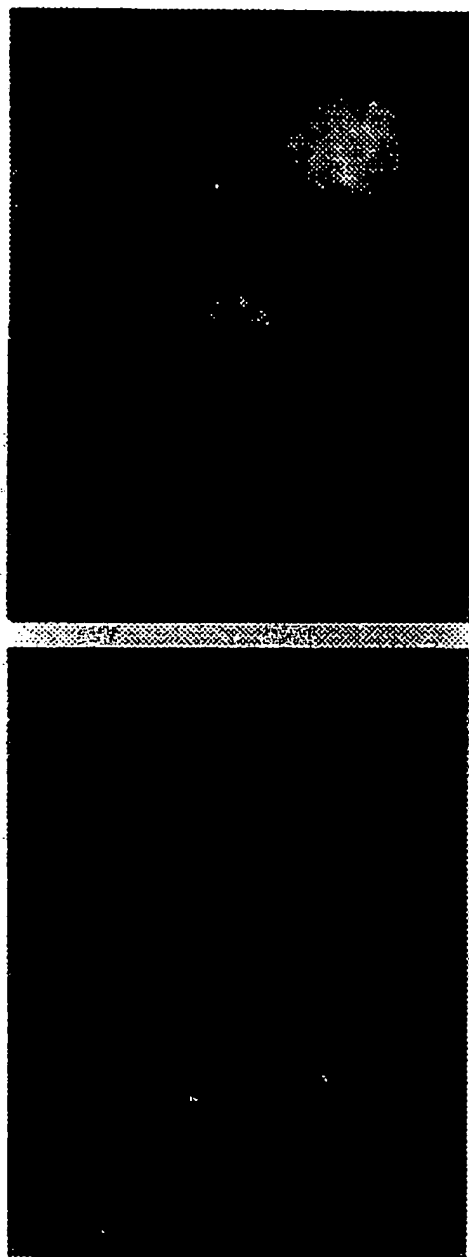


図 11



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁴ C12N15/12, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁴ C12N15/12, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	FEBS Lett. 418 (1997 Nov.) Khanh-Tuoc Le et al. "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system." p. 195-199	1-3
P, X	Cancer Res. 57 [15] (1997, Aug.) Tsutomu Urano et al. "Cloning of P2XM, a Novel Human P2X Receptor Gene Regulated by p53" p. 3281-3287	1-3
X	WO, 95/33048, A2 (クラクソ、グループ、リミテッド) 12.7月.1995 (12.07.95) & EP, 760850, A1 & JP, 10-501122, A	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.06.98

国際調査報告の発送日

30 jun 1998

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

古住 和之

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Receptors Channels 3 [4] (1995) Valera S et al "Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder" p.283-289	1 - 3

yt

HPS Trailer Page
for

Walk-Up Printing

Printer: cm1_11e14_gbegptr

Summary

Document	Pages	Printed	Missed
W0009842835	44	44	0
Total (1)	44	44	0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01146

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.C1⁶ C12N15/12, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.C1⁶ C12N15/12, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	FEBS Lett. <u>418</u> (1997 Nov.) Khanh-Tuoc Le et al., "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system." p.195-199	1-3
P, X	Cancer Res. <u>57</u> [15] (1997, Aug.) Tsutomu Urano et al., "Cloning of P2XM, a Novel Human P2X Receptor Gene Regulated by p53" p.3281-3287	1-3
X	WO, 95/33048, A2 (Glaxo Group Ltd.), July 12, 1995 (12. 07. 95) & EP, 760850, A1 & JP, 10-501122, A	1-3
X	Receptors Channels <u>3</u> [4] (1995) Valera S et al., "Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder" p.283-289	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 17, 1998 (17. 06. 98)Date of mailing of the international search report
June 30, 1998 (30. 06. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.